

RealStar®
***alpha* Herpesvirus PCR Kit 1.0**

08/2011

altona Diagnostics GmbH
Mörkenstr. 12
22767 Hamburg
Germany

phone +49 40 548 06 76 - 0
fax +49 40 548 06 76 - 10
e-mail info@altona-diagnostics.com

www.altona-diagnostics.com



always a drop ahead.

RealStar®

alpha Herpesvirus PCR Kit 1.0

Pour utilisation avec

m2000rt (Abbott Diagnostics)

Mx 3005P™ QPCR System (Stratagene)

VERSANT™ kPCR Molecular System AD (Siemens)

ABI Prism® 7500 SDS and 7500 Fast SDS (Applied Biosystems)

Rotor-Gene™ 3000/6000 (Corbett Research)

Rotor-Gene Q5/6 plex Platform (QIAGEN)



Usage de DIAGNOSTIC *IN VITRO*



Référence: 081013



96 tests



Conserver à -15°C ... -25°C



Août 2011



altona Diagnostics GmbH • Mörkenstraße 12 • D-22767 Hamburg

Sommaire

1. Usage prévu	6
2. Composants du kit	6
3. Conservation	6
4. Matériels requis non fournis	7
5. Informations générales	8
6. Description du produit	8
7. Mises en garde et précautions	11
8. Mode d'emploi	12
8.1 Préparation de l'échantillon	12
8.2 Préparation du Master Mix	13
8.3 Préparation de la réaction	15
9. Programmation des instruments de PCR en temps réel	15
9.1 Paramètres	16
9.2 Traceurs de fluorescence (dyes)	16
9.3 Profil de température et acquisition des dyes	16
10. Analyse des données qualitatif	17
10.1 Validité des tests de diagnostic	20
10.1.1 Validité des tests de diagnostic (qualitatif)	20
10.1.2 Invalidité des tests de diagnostic (qualitatif)	20
10.2 Interprétation des résultats	21
10.2.1 Analyse qualitative	21

11. Evaluation des performances	23
11.1 Sensibilité analytique	23
11.2 Spécificité analytique	25
11.3 Precision	27
11.4 Répétabilité	28
12. Limites et précautions	29
13. Contrôle qualité	30
14. Assistance technique	30
15. Marques déposées et responsabilité	30
16. Explications des symboles	31

1. Usage prévu

Le kit RealStar® *alpha* Herpesvirus PCR 1.0 est un test de diagnostic in vitro pour la détection et la différenciation simultanée de l'ADN spécifique des virus de l'herpes simplex 1 (HSV-1), de l'herpes simplex 2 (HSV-2), et du virus de la varicelle varicella-zoster (VZV).

2. Composants du kit

Couleur de couvercle	Bleu	Violet	Vert	Rouge	Orange	Jaune	Blanc
Composants	Master-mix A	Master-mix B	Contrôle interne	Contrôle positif VZV	Contrôle positif HSV-2	Contrôle positif HSV-1	Eau de qualité PCR
Nombre de flacons	8	8	1	1	1	1	1
Volume [µl/Vial]	60	180	1000	100	100	100	500

3. Conservation

- Le kit RealStar® *alpha* Herpesvirus PCR 1.0 est expédié sous carboglace. Les composants du kit doivent arriver congelés. Si un ou plusieurs composants ne sont pas congelés au moment de la réception, ou si l'un des tubes a été abîmé lors de la livraison, contacter altona Diagnostics GmbH pour demander conseil.
- Tous les composants doivent être conservés à -20°C dès la livraison.
- Des cycles répétés de décongélation et de congélation des réactifs (plus de deux) doivent être évités car ils peuvent affecter les performances du dosage. La conservation à +4°C ne doit pas excéder une durée de 2 heures.
- Protéger les Mastermix A et B de la lumière.

4. Matériels requis non fournis

- Instrument adapté à la PCR en temps réel (Chapitre 6: Description du produit)
- Système ou kit approprié à l'extraction des acides nucléiques
- Centrifugeuse de bureau avec rotor adapté à des tubes de 2 ml
- Centrifugeuse avec rotor pour plaques de microdosage, si vous utilisez des plaques de 96 puits de réaction
- Vortex
- Plaques de 96 puits de réaction ou tubes de réaction avec le matériel correspondant pour leur fermeture (optique)
- Pipettes (règlables)
- Cones de pipettes avec filtres (jetables)
- Gants non talqués (jetables)

NOTE

⚠ *Merci de vous assurer que les instruments ont été installés, calibrés, vérifiés et entretenus selon les instructions et les recommandations du fabricant.*

5. Informations générales

L'herpesviridae est une grande famille de virus à ADN qui provoque des maladies chez les animaux, dont les humains. Tous les virus de l'herpès sont composés d'un génome linéaire à double brin. Les virus de l'herpès se répliquent par le noyau, c'est à dire que la réplication de l'ADN viral se passe à l'intérieur des noyaux des cellules infectées. En fonction des différentes pathogénicités, des cellules hôtes et des caractéristiques de réplication, le virus de l'herpès peut être divisé en trois groupes: l'herpesviridae alpha-, beta-, et gamma. Le type alpha est caractérisé par un cycle de reproduction court, une destruction rapide des cellules hôtes et leur capacité de réplication dans les tissus hôtes. Une caractéristique importante de ces virus est leur capacité à établir une infection latente permanente dans le système nerveux périphérique de l'hôte. Le virus herpes simplex de type 1 (HSV-1), de type 2 (HSV-2) et le virus de la varicelle-zona (VZV) appartiennent à la famille alpha-herpesviridae.

6. Description du produit

Le kit RealStar® *alpha* Herpesvirus PCR 1.0 est un test de diagnostic in vitro pour la détection simultanée et la différenciation de l'ADN spécifique du virus herpes simplex de type 1 (HSV-1), de type 2 (HSV-2) et de la varicelle-zona (VZV). Le dosage comprend un système d'amplification hétérologue (Contrôle interne) afin d'identifier d'éventuelles inhibitions de la PCR et de confirmer l'intégrité des réactifs du kit.

Le test est basé sur la technologie de la PCR en temps réel, utilisant une réaction en chaîne par polymérase (PCR) pour l'amplification de séquences de cibles spécifiques et les sondes cibles spécifiques pour la détection de l'ADN amplifié. Les sondes sont marquées avec un marqueur fluorescent et un quencher.

Les sondes spécifiques à l'ADN du HSV-1 sont marquées avec le fluorophore ROX, Les sondes spécifiques à l'ADN du HSV-2 sont marquées avec un fluorophore qui présente les mêmes caractéristiques que le Cy5, les sondes spécifiques à l'ADN du

VZV sont marquées avec le fluorophore FAM. La sonde spécifique au Contrôle interne (CI) est marquée avec le fluorophore JOE. L'utilisation de sondes liées à des dyes permet la détection de l'ADN spécifique en parallèle avec la différenciation entre l'ADN spécifique du HSV-1, du HSV-2, et du VZV ainsi que la détection du Contrôle interne dans les différents canaux correspondant de l'instrument de PCR en temps réel.

Le test consiste en deux procédures réalisées dans un même tube à essai:

- l'amplification par PCR de l'ADN cible et le Contrôle interne
- Détection simultanée des amplicons par des sondes marquées par fluorescence

Le kit RealStar® *alpha* Herpesvirus PCR 1.0 a été développé et validé pour être utilisé avec les instruments de PCR suivants:

- m2000rt (Abbott Diagnostics)
- Mx 3005P™ QPCR System (Stratagene)
- VERSANT™ kPCR Molecular System AD (Siemens)
- ABI Prism® 7500 SDS and 7500 Fast SDS (Applied Biosystems)
- Rotor-Gene™ 3000/6000 (Corbett Research)
- Rotor-Gene Q 5/6 plex Platform (QIAGEN)

Le kit RealStar® *alpha* Herpesvirus PCR 1.0 est composé de:

- Deux Mastermix: (Mastermix A et Mastermix B)
- Modèle de Contrôle interne (CI)
- Contrôle positif: HSV-1
- Contrôle positif: HSV-2
- Contrôle positif: VZV
- Eau de qualité PCR

Les réactifs du Mastermix A et du Mastermix B contiennent tous les composants (tampon, enzyme, amorces, sondes) nécessaires à la réalisation de l'amplification par PCR, à la détection de la cible et à la différenciation de l'ADN spécifique du HSV-1, du HSV-2, et du VZV, ainsi que le contrôle interne, le tout en une seule mise en place de réaction.

7. Mises en garde et précautions

- L'utilisation de ce produit est limitée au personnel qualifié et formé pour les techniques de PCR en temps réel et aux procédures de diagnostic *in vitro*.
- Les échantillons doivent être manipulés comme s'ils étaient infectieux et/ou dangereux, en accord avec les procédures de sécurité en vigueur dans le laboratoire.
- Porter des gants jetables non talqués, une blouse de laboratoire et des lunettes de protection lors de la manipulation des échantillons.
- Éviter les contaminations microbiennes et nucléaires (par ADN/ARN) de l'échantillon et des composants du kit.
- Toujours utiliser avec les aérosols des cônes de pipettes jetables non contaminés par l'ADNase et l'ARNase.
- Toujours porter des gants de protection non talqués lors de la manipulation des composants des kits.
- Utiliser des aires de travail séparées les unes des autres pour (i) la préparation des échantillons, (ii) la préparation de la réaction et (iii) l'amplification et la détection de l'activité. Le flux de travail dans le laboratoire doit être unidirectionnel. Porter des gants dans chaque aire de travail et les changer avant d'entrer dans une aire différente.
- Consacrer les fournitures et le matériel aux différentes aires de travail et ne pas les déplacer d'une aire à une autre.
- Conserver le matériel positif ou bien potentiellement positif séparé des autres composants du kit.

- Ne pas ouvrir les tubes/plaques de réaction après l'amplification afin d'éviter les contaminations avec les amplicons.
- Des contrôles additionnels doivent être faits en accord avec les lignes directrices, aux exigences locales ou gouvernementales ou des organismes d'accréditation.
- Ne pas utiliser des composants au delà de leur date d'expiration.
- Éliminer les échantillons et les déchets d'essai selon la réglementation de sécurité locales.

8. Mode d'emploi

8.1 Préparation de l'échantillon

L'ADN extrait est le matériel de départ pour le kit RealStar® *alpha* Herpesvirus PCR 1.0. La qualité de l'ADN extrait a un impact important sur la performance de l'intégralité du test. Il est important de s'assurer que le système d'extraction des acides nucléiques utilisé est compatible avec la technologie de PCR en temps réel.

Les systèmes d'extraction nucléiques et les kits suivants sont recommandés:

- KingFisher® Flex (Thermo Scientific) avec ExtraStar® Purification Kit (Altona Diagnostics)
- VERSANT™ Molecular System SP (Siemens)
- HighPure® Viral Nucleic Acid Kit (Roche)
- QIAamp® DNA Mini Kit (QIAGEN)

Si pour la préparation des échantillons vous utilisez une colonne comportant des tampons de lavage avec de l'éthanol, une étape de centrifugation supplémentaire de 10 minutes à environ 17000 x g (~ 13000 rpm), en utilisant un nouveau tube à essai, est recommandé avant l'élution des acides nucléiques.

NOTE

⚠ L'utilisation d'ADN porteur est cruciale pour l'efficacité de l'extraction et la stabilité de l'acide nucléique extrait.

⚠ L'éthanol est un fort inhibiteur de la PCR en temps réel. Si votre système de préparation de l'échantillon utilise des tampons de lavage contenant de l'éthanol, assurez-vous d'éliminer toutes les traces d'éthanol avant de procéder à l'élution de l'acide nucléique.

Pour de plus amples informations ou un support technique concernant le pré-traitement et la préparation des échantillons, merci de contacter notre support technique:

e-mail: support@altona-diagnostics.com
téléphone: **+49-(0)40-5480676-0**

8.2 Préparation du Mastermix

Tous les réactifs doivent être complètement décongelés, homogénéisés (à la pipette ou vortexés doucement) et brièvement centrifugés avant leur utilisation.

Le kit RealStar® *alpha* Herpesvirus PCR 1.0 contient un contrôle interne hétérologue, peut être utilisé aussi bien comme un contrôle d'inhibition de la PCR ou comme un contrôle lors de la préparation de l'échantillon (extraction de l'acide nucléique) et aussi comme un contrôle de l'inhibition de la PCR.

- Si le contrôle interne est utilisé comme un contrôle d'inhibition de la PCR, mais pas comme un contrôle lors de la procédure de préparation de l'échantillon, alors le Mastermix doit être préparé comme décrit par le schéma de pipetage ci-dessous:

Nombre de réactions	1	12
Mastermix A	5 µl	60 µl
Mastermix B	15 µl	180 µl
Contrôle interne	1 µl	12 µl
Volume Mastermix	21 µl	252 µl

- Si le contrôle interne est utilisé comme un contrôle lors de la procédure de préparation de l'échantillon, et comme un contrôle d'inhibition de la PCR, le contrôle interne doit être ajouté au moment de la procédure d'extraction de l'acide nucléique.
- Peu importe la méthode ou le système utilisé pour l'extraction de l'acide nucléique, le contrôle interne **ne doit pas** être ajouté directement à l'échantillon. Le CI doit toujours être ajouté au mélange échantillon/tampon de lyse. Le volume de CI à ajouter dépend toujours et uniquement du volume d'élution. Il représente 10 % du volume d'élution. Par exemple si l'acide nucléique va être élué dans 60 µl de tampon d'élution ou de tampon, 6 µl de CI par échantillon doivent être ajoutés au mélange échantillon/tampon de lyse.

NOTE

 **Ne jamais ajouter le Contrôle Interne directement avec l'échantillon!**

- Si le CI a été ajouté pendant la phase de préparation de l'échantillon, le Mastermix doit être préparé selon le schéma de pipetage suivant:

Nombre de réactions	1	12
Mastermix A	5 µl	60 µl
Mastermix B	15 µl	180 µl
Volume Mastermix	20 µl	240 µl

8.3 Préparation de la réaction

- Pipeter 20 µl de Mastermix dans chacun des puits nécessaires de la plaque 96 puit ou d'un tube à essai permettant les réactions optiques.
- Ajouter 10 µl de l'échantillon (élué à partir de l'extraction d'acide nucléique) ou 10 µl des contrôles (calibrateurs, contrôles positifs ou négatifs).
- Assurez vous qu'il y a au moins un contrôle positif et un négatif par essai.
- Pour une détermination quantitative, tous les calibrateurs (QS1 à to QS4) doivent être utilisés.
- Homogénéiser avec soin les échantillons et les contrôles avec le Mastermix en pipétant.
- Couvrir la plaque de 96 puits avec un film adhésif opaque approprié et les tubes à essai avec un couvercle approprié.
- Centrifuger les plaque de 96 puits avec un rotor à microplaque pendant 30 secondes à environ 1000 x g (~ 3000 rpm).

Préparation de la réaction	
Mastermix	20 µl
Echantillon ou contrôle	10 µl
Volume total	30 µl

9. Programmation des instruments de PCR en temps réel

Pour des informations basiques concernant l'installation et la programmation des différents instruments de PCR en temps réel, merci de vous référer au manuel d'utilisation des différents instruments. Pour des instructions de programmation détaillées concernant l'utilisation du kit RealStar® *alpha* Herpesvirus PCR 1.0 sur un instrument de PCR en temps réel spécifique, merci de contacter notre support technique.

9.1 Paramètres

- Définir les paramètres suivants:

Paramètres	
Volume de réaction	30 µl
Taux de rampe	par défaut
Référence passive	ROX

9.2 Traçeurs de fluorescence (dyes)

- Définir les traçeurs de fluorescence (dyes):

Detection	Nom de traçeur	Reporteur	Quencher
ADN spécifique VZV	VZV	FAM	(rien)
ADN spécifique HSV-1	HSV-1	ROX	(rien)
ADN spécifique HSV-2	HSV-2	Cy5	(rien)
Contrôle interne (CI)	CI	JOE	(rien)

9.3 Profil de température et acquisition des dyes

- Définir le profil de température et l'acquisition des dyes:

	Etape	Nombre cycles	Aquisition	Temperature	Durée
Dénaturation	Tenu	1	-	95 °C	10:00 min
Amplification	Cyclique	45	-	95 °C	0:15 min
			√	58 °C	1:00 min

10. Analyse des données

Pour des informations basiques concernant l'analyse des données sur des instrument spécifique de PCR en temps réel, merci de se référer au manuel concerné. Pour des informations détaillées concernant l'analyse des données avec le kit RealStar® *alpha* Herpesvirus PCR 1.0 sur différents instruments de PCR en temps réel, merci de contacter notre support technique.

L'analyse des données si vous utilisez le ABI Prism® 7500 SDS ou le 7500 Fast SDS (Applied Bio- systems), le m2000rt (Abbott Diagnostics), le VERSANT™ KPCR System (Siemens) ou le Mx3005P™ QPCR System (Stratagene):

Si vous utilisez un de ces systèmes de PCR en temps réel, il n'y aura pas d'interférences entre les différentes canaux de détection, si l'étalonnage des dyes purs a été bien réalisé (Fichier de composition du spectre pur) ainsi que le blanc (Fichier de composition du blanc). Par conséquent, le signal de l'ADN spécifique du VZV n'apparaît que dans le canal de détection du FAM, l'ADN spécifique du HSV-1 n'apparaît que dans le canal de détection du ROX, l'ADN spécifique du HSV-2 n'apparaît que dans le canal de détection du Cy5 et le Contrôle interne n'est visible que dans le canal de détection du JOE (voir figure 1).

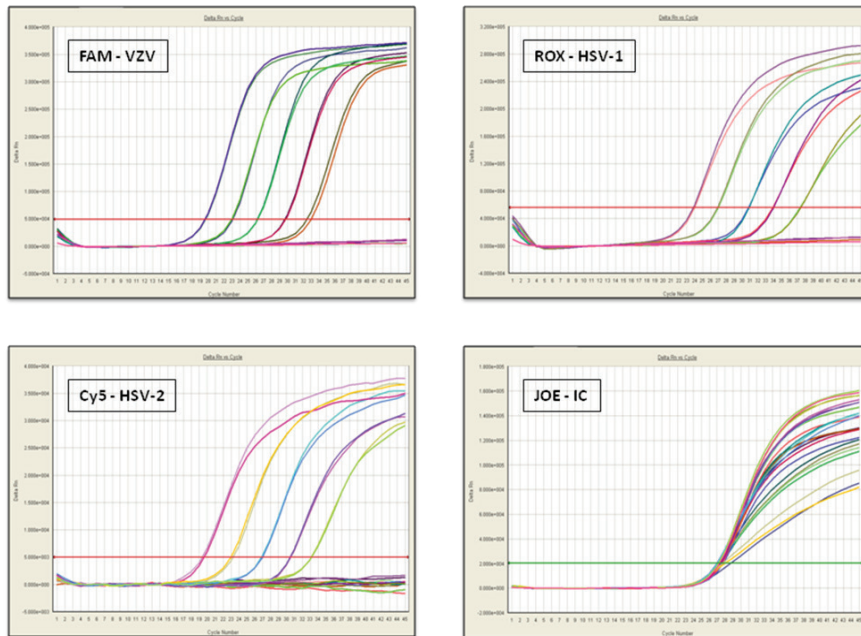


Figure 1: Dilutions en série de l'ADN spécifique de VZV, HSV-1, et de HSV-2 de 1 copie/ μ l à 10^4 copies/ μ l. Les échantillons ont été analysés en utilisant le kit RealStar® *alpha* Herpesvirus PCR 1.0 sur un ABI Prism® 7500 SDS (Applied Biosystems). Les échantillons positifs à l'ADN de VZV génère des signaux dans le canal de détection FAM. Les échantillons positifs à l'ADN de HSV-1 génère des signaux dans le canal de détection de ROX et les échantillons positifs à l'ADN de HSV-2 génère des signaux dans le canal de détection de Cy5. Le contrôle interne génère des signaux dans le canal de détection de JOE.

Analyse des données en utilisant le Rotor-Gene™ 3000/6000 (Corbett Research) ou le Rotor-Gene Q 5/6 plex Platform (QIAGEN):

L'utilisation du Rotor-Gene™ 3000/6000 (Corbett Research) ou du Rotor-Gene Q 5/6 plex Platform (QIAGEN) peut entraîner de légères interférences entre les chaînes de détection ROX et Cy5. Par conséquent, le signal de l'ADN spécifique de **VZV** n'apparaîtra que sur la chaîne de détection verte FAM, celui du **HSV-2** n'apparaîtra que sur la chaîne de détection rouge (Cy5) et le signal spécifique du contrôle interne n'apparaîtra que sur la chaîne jaune (JOE) (voir figure 2). Cependant, le signal de l'ADN spécifique du **HSV-1** n'apparaît pas uniquement dans la

chaîne de détection orange (ROX), mais produit également un signal faible d'interférence dans la chaîne de détection Cy5. Ce signal d'interférence dans le Cy5 sera toujours plus faible (fluorescence plus faible) qu'un signal produit par un échantillon d'ADN spécifique de **HSV-2** dans le Cy5. Par conséquent nous recommandons fortement d'analyser les échantillons en comparant avec les contrôles positifs des VZV, HSV-1, et HSV-2 (voir figure 2). Si vous avez des questions relatives à l'analyse de données sur l'automate Rotor-Gene, merci de contacter notre support technique.



Figure 2: Dilution en séries d'ADN spécifique de VZV, HSV-1, et de HSV-2 de 10 copies/ μ l à 10^4 copies/ μ l. Les échantillons ont été analysés en utilisant le kit RealStar® *alpha* Herpesvirus PCR 1.0 sur un instrument Rotor-Gene™ 6000 (Corbett-Research). Les échantillons positifs à l'ADN de VZV génèrent des signaux uniquement dans la chaîne de détection verte (FAM), les échantillons positifs à l'ADN de HSV-2 génère des signaux seulement dans la chaîne de détection rouge (Cy5) et le contrôle interne génère des signaux uniquement dans le Jaune (JOE). Les échantillons positifs à l'ADN de HSV-1 génère des signaux non seulement dans l'orange (ROX) mais aussi un signal plus faible dans la chaîne de détection du Cy5. Ce signal d'interférence sera toujours plus faible (fluorescence plus faible) qu'un signal produit par un échantillon positif à l'ADN de HSV-2 dans le Cy5.

10.1 Validité des tests de diagnostic

10.1.1 Validité des tests de diagnostic (qualitatif)

Pour un test de diagnostic **valide** (qualitatif), les valeurs suivantes des contrôles doivent être respectés:

Nom du Contrôle	Canal de détection FAM	Canal de détection ROX	Canal de détection Cy5	Canal de détection JOE
Contrôle positif VZV	POSITIF	NEGATIF	NEGATIF	POSITIF
Contrôle positif HSV-1	NEGATIF	POSITIVE	NEGATIF ^Δ	POSITIF
Contrôle positif HSV-2	NEGATIF	NEGATIF	POSITIVE	POSITIF
Contrôle négatif	NEGATIF	NEGATIF	NEGATIF	POSITIF

^Δ Des signaux d'interférence peuvent apparaître dans la chaîne de détection rouge (Cy5) si vous utilisez un automate Rotor-Gene™ 3000/6000 (Corbett Research) ou un Rotor-Gene Q5/6 plex Platform (QIAGEN).

10.1.2 Invalidité des tests de diagnostic (qualitatif)

Un test de diagnostic **qualitatif** est **invalide**, (i) si l'essai n'a pas été réalisé complètement ou (ii) si l'une des conditions de contrôle pour l'un des tests de validité du test de diagnostic n'est pas respecté.

En cas de test de diagnostic **invalide**, répéter le test en utilisant les acides nucléiques purifiés restants ou recommencer avec l'échantillon de départ.

10.2 Interprétation des résultats

10.2.1 Analyse qualitative

No. de échantillon	Canal de détection FAM	Canal de détection ROX	Canal de détection Cy5	Canal de détection JOE	Interprétation résultats
A	POSITIF	NEGATIF	NEGATIF	POSITIF*	ADN spécifique de VZV détecté.
B	NEGATIF	POSITIF	NEGATIF ^Δ	POSITIF*	ADN spécifique de HSV-1 détecté.
C	NEGATIF	NEGATIF	POSITIF	POSITIF*	ADN spécifique de HSV-2 détecté.
D	NEGATIF	NEGATIF	NEGATIF	POSITIF	Pas d'ADN de VZV, ou de HSV-1 ni de HSV-2 détecté. L'échantillon ne contient pas de quantité détectable de ces ADN spécifiques.
E	NEGATIF	NEGATIF	NEGATIF	NEGATIF	Inhibition ou échec de la réaction. Répéter le test à partir de l'échantillon original ou bien en prélever un nouveau.

* La détection du contrôle interne dans le canal de détection JOE n'est pas requise pour les résultats positifs dans le canal de détection FAM. De hautes charges virales en *alpha* Herpesvirus dans l'échantillon peuvent conduire à des signaux du contrôle interne réduits ou absents.

^Δ Un signal d'interférence peut apparaître dans la chaîne de détection rouge (Cy5) si vous utilisez un automate Rotor-Gene™ 3000/6000 (Corbett Research) ou un Rotor-Gene Q5/6 plex Platform (QIAGEN).

11. Evaluation des performances

En l'absence de standards internationaux disponibles pour le VZV et/ou pour le HSV-1 et/ou HSV-2, l'évaluation des performances du kit RealStar® *alpha* Herpesvirus PCR 1.0 a été faite en utilisant de l'ADN spécifique de VZV (souche VZV ELLEN; ATCC® Numéro: VR-1367), de l'ADN spécifique de HSV-1 (ATCC® Numéro: VR-1493) et de l'ADN spécifique de HSV-2 (ATCC® Numéro: VR-540).

11.1 Sensibilité analytique

La sensibilité analytique du kit RealStar® *alpha* Herpesvirus PCR 1.0 est définie comme étant la concentration (copies par µl d'éluat) de molécules d'ADN spécifique du virus VZV ou HSV-1 ou HSV-2 qui peuvent être détectées avec un taux supérieur à ≥ 95 %. La sensibilité analytique a été déterminée en analysant les dilutions en série d'ADN quantifié de VZV, d'HSV-1 et d'HSV-2.

Table 1: Résultats de PCR utilisés pour le calcul de la sensibilité analytique du kit RealStar® *alpha* Herpesvirus PCR 1.0

[C] initiale [copies/µl]	Nombre de cycles	Nombre de positifs	Taux de succès [%]
3.16	17	17	100
1.0	18	18	100
0.316	18	18	100
0.1	18	17	94.4
0.03	18	7	38.9
0.01	18	6	33.3
0.003	18	1	5.6
0.001	12	0	0
NTC	12	0	0

La sensibilité analytique du kit RealStar® *alpha* Herpesvirus PCR 1.0, déterminée par analyse Probit est de 0.2 copies/µl d'éluat [intervalle de confiance à 95 % (CI): 0.1 – 1.5 copies/µl].

Table 2: Résultats de PCR utilisés pour le calcul de la sensibilité analytique du système spécifique au HSV-1 du kit RealStar® *alpha* Herpesvirus PCR 1.0

[C] initiale [copies/µl]	Nombre de cycles	Nombre de positifs	Taux de succès [%]
3.16	12	12	100
1.0	12	12	100
0.32	12	11	91.7
0.1	12	8	66.7
0.03	12	2	16.7
0.01	12	2	16.7
0.003	12	0	0
0.001	12	0	0
NTC	12	0	0

La sensibilité analytique du kit RealStar® *alpha* Herpesvirus PCR 1.0 pour la détection de l'ADN spécifique de HSV-1 a été déterminée par analyse probit à 0.46 copies/µl d'éluat [intervalle de confiance à 95 % (CI): 0.23 – 1.8 copies/µl].

Table 3: Résultats de PCR pour le calcul de la sensibilité analytique du système spécifique au HSV-2 du kit RealStar® *alpha* Herpesvirus PCR 1.0

[C] initiale [copies/μl]	Nombre de cycles	Nombre de positifs	Taux de succès [%]
10	12	12	100
3.16	12	12	100
1.0	12	12	100
0.32	12	10	83.3
0.1	12	3	25
0.03	12	1	8.3
0.01	12	2	16.7
0.003	12	0	0
NTC	12	0	0

La sensibilité analytique du kit RealStar® *alpha* Herpesvirus PCR 1.0 pour la détection de l'ADN spécifique de HSV-2 a été déterminée par analyse probit à 1.00 copie/μl d'éluat [intervalle de confiance à 95 % (CI): 0.5 – 4.1 copies/μl].

11.2 Spécificité analytique

La spécificité analytique du kit RealStar® *alpha* Herpesvirus PCR 1.0 a été évaluée en testant un panel d'ADN/ARN génomique extrait d'autres virus de l'herpès ou d'autres pathogènes significatifs chez les patients immunodéprimés.

Table 4: Les organismes testés afin de démontrer la spécificité analytique du kit RealStar® *alpha* Herpesvirus PCR 1.0

	RealStar® <i>alpha</i> Herpesvirus PCR Kit 1.0			
Organismes	Canal FAM [VZV]	Canal ROX [HSV-1]	Canal Cy5 [HSV-2]	Contrôle interne
Herpes Simplex Virus 1	Negatif	Positif	Negatif	Valide
Herpes Simplex Virus 2	Negatif	Negatif	Positif	Valide
Varicella Zoster Virus	Positif	Negatif	Negatif	Valide
Epstein-Barr Virus	Negatif	Negatif	Negatif	Valide
Cytomegalovirus	Negatif	Negatif	Negatif	Valide
Human Herpesvirus 6	Negatif	Negatif	Negatif	Valide
Human Herpesvirus 7	Negatif	Negatif	Negatif	Valide
Human Herpesvirus 8	Negatif	Negatif	Negatif	Valide
BK Virus	Negatif	Negatif	Negatif	Valide
JC Virus	Negatif	Negatif	Negatif	Valide
Parvovirus B19	Negatif	Negatif	Negatif	Valide
Hepatitis B Virus	Negatif	Negatif	Negatif	Valide
Hepatitis C Virus	Negatif	Negatif	Negatif	Valide
Human Immunodeficiency Virus 1	Negatif	Negatif	Negatif	Valide

Le kit RealStar® *alpha* Herpesvirus PCR 1.0 n'a présenté aucune réaction croisée avec des organismes spécifiés ci dessus.

11.3 Précision

Les données de précision pour le kit RealStar® *alpha* Herpesvirus PCR 1.0 ont été déterminées comme la variabilité intra dosage (variabilité à l'intérieur d'un seul essai), la variabilité inter dosage (variabilité entre différents essais) et la variabilité inter lot (variabilité entre des lots de productions différentes).

La variabilité des données est exprimée en terme d'écart type, de variance et de coefficient de variation. Les données sont basées sur l'analyse quantitative des concentrations définies d'ADN spécifique de VZV-, HSV-1-, et de HSV-2 et sur la valeur seuil du cycle (Ct) en terme de contrôle interne. Au moins six répétitions par échantillon ont été analysées pour la variabilité intra dosage, inter dosage et inter lot. La variance totale a été calculée en combinant les trois analyses.

Table 5: Données de précision pour le système spécifique VZV, HSV-1 and HSV-2 du kit RealStar® *alpha* Herpesvirus PCR 1.0

	Système spécifique	[C] moyenne (copies/µl)	Ecart type	Variance	Coefficient de Variation (%)
Variabilité Intra-dosage	VZV	86.3	4.0	15.8	4.6
	HSV-1	96.0	4.7	22.4	4.9
	HSV-2	91.5	7.3	52.7	7.9
Variabilité Inter-dosage	VZV	92.8	8.2	67.4	8.9
	HSV-1	96.2	5.8	33.1	6.0
	HSV-2	95.3	7.8	60.8	8.2
Variabilité Inter-Lot	VZV	89.4	4.2	17.4	4.7
	HSV-1	96.0	4.8	23.3	5.0
	HSV-2	89.9	8.2	66.6	9.1
Variance totale	VZV	92.6	6.8	45.7	7.3
	HSV-1	96.1	5.5	29.9	5.7
	HSV-2	92.9	8.7	76.4	9.4

Table 6: Données de précision pour le contrôle interne du kit RealStar® *alpha* Herpesvirus PCR 1.0. Les échantillons qui ont été analysés contenaient 10 copies/µl de l'ADN cibles respectif.

Contrôle interne	Système spécifique	Ecart type	Variance	Coefficient de Variation (%)
Variabilité Intra-dosage	VZV	0.02	0.001	0.10
	HSV-1	0.06	0.004	0.25
	HSV-2	0.17	0.031	0.76
Variabilité Inter-dosage	VZV	0.05	0.002	0.19
	HSV-1	0.07	0.005	0.29
	HSV-2	0.13	0.018	0.58
Variabilité Inter-Lot	VZV	0.06	0.004	0.24
	HSV-1	0.12	0.015	0.49
	HSV-2	0.15	0.022	0.64
Variance totale	VZV	0.06	0.003	0.23
	HSV-1	0.1	0.011	0.41
	HSV-2	0.13	0.017	0.57

11.4 Répétabilité

Afin de s'assurer de la répétabilité du kit RealStar® *alpha* Herpesvirus PCR 1.0, la spécificité et la sensibilité sont évaluées en analysant des panels compétente déjà établis pour VZV, HSV-1 et HSV-2 ainsi que des échantillons de diagnostic analysées sur une base régulière

12. Limites et précautions

- L'utilisation de ces produits est limitée au personnel compétent et formé aux techniques de PCR en temps réel et aux procédures de diagnostic *in vitro*.
- Le respect des Bonnes Pratiques de Laboratoire est essentiel pour assurer la performance du dosage. Une attention particulière doit être donnée à la préparation des échantillons afin de préserver la pureté des composants du kit. Tous les réactifs doivent être minutieusement suivis afin d'éviter les impuretés et les contaminations. Le moindre réactif douteux doit être écarté.
- Il est nécessaire de respecter les procédures de prélèvement de l'échantillon, de transport et de conservation afin d'assurer les performances optimales du test.
- Ce dosage n'est pas destiné à être réalisé directement sur l'échantillon. L'extraction des acides nucléiques doit avoir été réalisée au préalable.
- La présence des inhibiteurs de PCR peut être une cause de faux négatifs ou de résultats erronés.
- De potentielles mutations dans les régions du génome du VZV, HSV-1 et/ou HSV-2 couvertes par les amorces et/ou les sondes peuvent conduire à de mauvais résultats pour la détection du virus.
- Comme avec tous les tests de diagnostic, les résultats du kit RealStar® *alpha* Herpesvirus PCR 1.0 doivent être interprétés en prenant en considération tous les symptômes cliniques.

13. Contrôle de qualité

D'après le système de management de la qualité d'altona Diagnostics GmbH selon ISO EN 13485, chaque lot du kit RealStar® *alpha* Herpesvirus PCR 1.0 est testé selon les spécifications prédéfinies afin d'assurer la qualité constante du produit.

14. Assistance technique

Pour le support client, merci de contacter notre support technique:

e-mail: support@altona-diagnostics.com
téléphone: +49-(0)40-5480676-0

15. Marques déposées et responsabilité

RealStar® (altona Diagnostics GmbH); Mx 3005P™ (Stratagene); ABI Prism® (Applied Biosystems); HighPure®, LightCycler® (Roche); Rotor-Gene™, QIAamp® (QIAGEN); VERSANT™ (Siemens); KingFisher® (Thermo Scientific).

Les noms déposés, les marques déposées, etc. utilisées dans ce document, même si ils ne sont pas spécifiés comme tels ne doivent pas être considérées comme non protégées par la loi.

Le kit RealStar® *alpha* Herpesvirus PCR 1.0 est un test de diagnostic *in vitro*, marqué CE, en accord avec la Directive européenne 98/79/EC.

N'est pas disponible dans tous les pays.

© 2011 altona Diagnostics GmbH; tous droits réservés.

16. Explications des symboles



Dispositif Medical de Diagnostic *in Vitro*



Référence produit



Numéro de lot



Contient le nombre suffisant pour réaliser „n“ tests



Limites de température



Utiliser avant



Version



Se reporter au manuel d'utilisation



Attention



Fabricant

